

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年6月23日 (23.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/056790 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, C12Q 1/68 5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018137
- (22) 国際出願日: 2004年12月6日 (06.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-412326
2003年12月10日 (10.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 上森 隆司 (UE-MORI, Takashi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 武田 理 (TAKEDA, Osamu) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 山本 純子 (YAMAMOTO, Junko) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 向井 博之 (MUKAI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 浅田 起代蔵 (ASADA, Kiyozo) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF AMPLIFYING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸の増幅方法

(57) Abstract: In the case where a template nucleic acid has sequences substantially the same as each other, a primer is designed in a region between these sequences so as to give a product in a ladder structure in which a target region is polymerized in a single sequence via the same sequences in the ICAN reaction. By using a chimeric oligonucleotide primer and a ladder-forming oligonucleotide primer containing a specific base sequence, an amplification product having a ladder structure can be actively formed and thus the sensitivity, amplification efficiency and reaction speed in the ICAN reaction can be elevated.

(57) 要約: 鋳型核酸中に実質的に同一配列が存在する場合に、その配列に挟まれた領域内にプライマーを設計することにより、ICAN反応においてターゲット領域が上記同一配列を介して同一方向に重合したラダー状産物ができる。さらにキメラオリゴヌクレオチドプライマーと特定の塩基配列を含むラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、増幅産物を積極的にラダー状にすることでICAN反応の感度、増幅効率および反応速度を向上させることができる。

WO 2005/056790 A1

明 細 書

核酸の増幅方法

技術分野

- [0001] 本発明は、臨床分野において有用な標的核酸の検出方法及び遺伝子工学分野において有用なDNAの合成方法に関し、鋳型となる核酸の増幅方法および該方法で増幅された標的核酸の検出方法に関する。

背景技術

- [0002] 遺伝子工学分野の研究においてDNAの合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖のDNAの合成を除けば、そのほとんどはDNAポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Polymerase Chain Reaction)法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

- [0003] 従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類〜3種類の温度条件で行なうための設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

- [0004] そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。

等温で実施可能な方法としては、例えば、鎖置換型増幅(SDA; Strand Displacement Amplification)法(例えば、特許文献1参照)、RCA(Rolling Circle Amplification)法(例えば、特許文献2参照)、LAMP(Loop-mediated isothermal AMplification)法(例えば、特許文献3参照)、ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)法(例えば、特許文献4参照)、あるいは種々の改良SDA法(例えば、特許文献5〜8参照)等が挙げられる。

- [0005] これらの等温核酸増幅法またはオリゴヌクレオチド合成法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物(または元の標的配列)へのプライマーのアニールリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。
- [0006] 上記特許文献1記載のSDA法は、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼを介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列(およびその相補鎖)の増幅法である。該方法では、増幅に使用するプライマーは4種類必要であり、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、DNA合成のための基質として、修飾されたデオキシリボヌクレオチド3リン酸、例えば α 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子(S)に置換された(α -S)デオキシリボヌクレオチド3リン酸を大量に用いる必要がある。
- [0007] 上記特許文献2記載のRCA法は、環状DNAを鋳型とした核酸増幅方法である。得られる増幅産物は、増幅領域が複数回繰り返された配列を有し、また、増幅産物が新たな鋳型として機能するため、最終的な増幅産物は、ブランチング(branching)と呼ばれる分岐構造を有している。さらに、RCA法に関連して、増幅効率を向上させるためには、副反応で生成するラダー状増幅産物を抑制することが重要であるという報告がある。(例えば、非特許文献1参照)
- [0008] 上記特許文献3記載のLAMP法は、増幅に4種類のプライマーを必要とする。また、得られる増幅産物は、増幅の標的とされた領域が繰り返された、サイズの一定しないラダー状DNAである。当該DNAにおいてターゲット領域は、交互に方向が変わった状態で連結されている。
- [0009] 上記特許文献4記載のICAN法は、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いた核酸増幅方法である。
- [0010] 上記特許文献5記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、少なくとも3'末端にDNAが配置された構造を必須要件とするキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するDNA増幅方法である。
- [0011] 上記特許文献6記載の改良SDA法は、3'突出末端を生じさせる制限酵素が必要である。

- [0012] 上記特許文献7記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマー対を必要とする。
- [0013] 上記特許文献8記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマーと少なくとも1種類の修飾デオキシリボヌクレオチド3リン酸を必要とする。
- [0014] 以上のように、等温核酸増幅法が開発されているが、これらの方法も、増幅効率、検出感度などの問題があった。そこで、この問題点を解決すべく、改良型等温核酸増幅法が開発された(例えば、特許文献9〜11参照)。
- [0015] 特許文献9記載の方法は、逆転写プライマーもしくは核酸増幅用プライマーの5'末端にRNAポリメラーゼプロモータもしくはその一部を付加し、さらにその5'末端に少なくとも5塩基を含む任意のオリゴヌクレオチドを付加したプライマー、および該プライマーの上流領域もしくは該プライマーのRNAポリメラーゼプロモータ部位にアニーリングする第3のプライマーを用いた核酸増幅方法である。
- [0016] 特許文献10記載の方法は、少なくとも2種の相補的プライマーを用いた核酸増幅方法、および少なくとも2種類のプライマー対を用いた核酸増幅方法である。
- 該方法は、複数のプライマーもしくはプライマー対を用いることにより、増幅産物の生成量を向上させる方法であり、生成量を向上させるためにはより多くのプライマーもしくはプライマー対を用いる必要がある。
- [0017] 特許文献11記載の方法は、特許文献12記載の方法において、キメラオリゴヌクレオチドプライマー、および鋳型となる核酸の該プライマーがハイブリダイズする位置の3'側にハイブリダイズする上流オリゴヌクレオチドプライマーとを組合わせて使用する方法である。
- 該方法において、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは鋳型鎖にハイブリダイズする配列のみからなる。
- [0018] このように、従来の等温核酸増幅法はまだまだ種々の問題をかかえており、効率よく、高感度でできる方法が求められていた。
- [0019] 特許文献1:特公平7-114718号公報
特許文献2:国際公開第97/19193号パンフレット
特許文献3:国際公開第00/28082号パンフレット

特許文献4:国際公開第00/56877号パンフレット

特許文献5:米国特許番号第5,824,517号明細書

特許文献6:国際公開第99/09211号パンフレット

特許文献7:国際公開第95/25180号パンフレット

特許文献8:国際公開第99/49081号パンフレット

特許文献9:国際公開第95/03426号パンフレット

特許文献10:国際公開第95/25180号パンフレット

特許文献11:特開2003-52380号公報

非特許文献1:Hafner G. J. 他4名、BioTechniques, vol. 30 (2001) p852-867

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0020] 本発明の主な目的は、試料中の標的核酸の高感度、特異的に増幅する標的核酸の増幅方法、これらの方法のための組成物およびキットを提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0021] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した。その結果、鋳型核酸中に実質的に同一配列が存在する場合に、その配列に挟まれた領域内にプライマーを設計することにより、ICAN反応においてターゲット領域が上記同一配列を介して同一方向に重合したラダー状産物ができることを見出した。さらにキメラオリゴヌクレオチドプライマーと特定の塩基配列を含むラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、増幅産物を積極的にラダー状にすることでICAN反応の感度、増幅効率および反応速度を向上させることができることを見出し、本発明を完成させた。
- [0022] すなわち、本発明の第1の発明は、核酸を増幅する方法において、
- (A) 下記(a)又は(b)から選択される反応混合物を調製する工程、
- (a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseH、
- (b) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポ

リメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseH、ここで、一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーはラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとして作用し、

ここで、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されており、

上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に相補的な第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型となる核酸の塩基配列に相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2種類を含んでおり、

上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域および／またはその領域より3'側の塩基配列に相補的な配列を有し、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに5'側方向の領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な配列を5'側に有し、

および

(B)鋳型となる核酸へのプライマーの特異的なアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長鎖合成反応及び鎖置換反応、並びにRNaseHによる伸長鎖の切断反応が行える一定の温度条件でラダー状増幅産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法に関する。

- [0023] 本発明の第1の発明において、鋳型となる核酸はRNAであり、当該核酸をあらかじめデオキシリボヌクレオチド3リン酸、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼ及び少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーで処理し、逆転写産物としてもよい。
- [0024] 本発明の第1の発明において、工程(A)における反応混合物は、さらに逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含有してもよい。
- [0025] 本発明の第1の発明において、鋳型となる核酸は、mRNAであってもよい。

- [0026] 本発明の第1の発明において、逆転写活性と鎖置換活性とを有する1つのDNAポリメラーゼを用いてもよい。
- [0027] 本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の方法のための組成物であって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物に関する。
- [0028] 本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明のためのキットであって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを含有するキットに関する。
- [0029] 本発明の第4の発明は、下記工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法に関する。
- (a) 本発明の第1の方法により、標的核酸を増幅する工程；および、
 - (b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程。
- [0030] 本発明の第5の発明は、本発明の第1の発明の方法に用いるプライマーであって、鋳型となる核酸と相同的なプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに5'側方向の領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な配列を5'側に有することを特徴とするオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

発明の効果

- [0031] 本発明により、従来の等温核酸増幅方法より優れた増幅方法、該方法に用いるためのプライマーを含む組成物およびキットが提供される。

図面の簡単な説明

- [0032] [図1]実施例2-(1)-(A)にて使用している第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー、第二オリゴヌクレオチドプライマー、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの位置関係に関する図である。(a)は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー、(b)～(d)はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、(e)は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーを示す。(b)～(d)において、1の部分は(e)の5'上流の相補鎖の1と相同な配列を有する。
- [図2]各コピー数における増幅曲線を示す図である。図2において、横軸は反応サイ

クル数を、縦軸は蛍光強度を示す。図2において、aは 10^5 コピー数、bは 10^4 コピー数、cは 10^3 コピー数、dは 10^2 コピー数、eは 10^1 コピー数、fは 10^0 コピー数の鋳型を用いた場合の増幅曲線である。

発明を実施するための最良の形態

- [0033] 本明細書においてデオキシリボヌクレオチド(本明細書中ではdNとも記載する)とは、糖部分がD-2-デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。さらに、7-デアザグアノシン等の修飾塩基を有するものや、あるいは固定化に使用できるような官能基を有するデオキシリボヌクレオチドやデオキシイノシンヌクレオチドのようなデオキシリボヌクレオチドアナログも上記のデオキシリボヌクレオチドに包含される。
- [0034] 本明細書においてリボヌクレオチド(本明細書中ではNとも記載する)とは、糖部分がD-リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチドが包含され、例えば α 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子(S)に置き換えた修飾リボヌクレオチド[(α -S)リボヌクレオチド、(α -S)Nとも記載する]やその他の誘導体等も含まれる。
- [0035] 本明細書においてキメラオリゴヌクレオチドプライマーとは、該プライマーの3'末端又は3'末端側にリボヌクレオチドを配置し、本発明の方法において核酸鎖が伸長でき、RNaseHで切断でき、鎖置換反応を行うことができるオリゴヌクレオチドプライマーのことをいい、該構成を有するものであれば、いずれもが本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに包含される。
- 本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。該プライマーには未修飾リボヌクレオチドおよび/または修飾リボヌクレオチドを含有するオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。
- 本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有する。なお、ここで「実質的に

相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。

- [0036] 本明細書において3'側とは、核酸、例えば、プライマーにおいてその中央より3'末端にかけての部分を用いる。同様に、5'側とは、核酸においてその中央より5'末端にかけての部分を用いる。
- [0037] 本明細書において上流領域とは、使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同的な鋳型鎖において該キメラオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列の5'末端よりさらに5'側方向の領域のことを言う。従って、該鋳型鎖の相補鎖から見ると、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列に相補的な配列の3'末端よりさらに3'側方向の領域に相当する。
- [0038] また、本明細書においてラダー形成のための塩基配列とは、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに上流領域(すなわち、5'側方向の領域)に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列のことを言う。
- [0039] 本明細書においてラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとは、当該プライマーの5'側に上記ラダー形成のための塩基配列を含むもののことを言う。
- [0040] 本明細書において塩基配列の位置は、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端およびその位置に対する該キメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングする鋳型鎖の位置を「0」とし、該キメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端側へ向けて順次整数で「+1」、「+2」、...とする。また、該鋳型となる核酸の「0」位置より1塩基上流を「-1」とし、上流へ向けて順次整数で「-2」、「-3」、...とする。
- [0041] 本明細書においてRNaseH(リボヌクレアーゼH)とは、鋳型核酸にアニーリングした上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、該プライマーのリボヌクレオチド部分を特異的に切断するものであればよい。
- [0042] 本明細書においてDNAポリメラーゼとは、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を

合成する酵素 (DNA依存性DNAポリメラーゼ) およびRNA鎖を鋳型として該RNA鎖に相補的なDNA鎖を合成する酵素 (RNA依存性DNAポリメラーゼ) のことをいい、天然型のDNAポリメラーゼの他、前記活性を有する変異体酵素も包含される。当該酵素としては、例えば鎖置換 (Strand displacement) 活性を有するDNAポリメラーゼ、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有していないDNAポリメラーゼ、逆転写酵素活性やRNaseH活性を併せ持つDNAポリメラーゼが挙げられる。

[0043] 本明細書において「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換 (strand displacement) することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを「置換鎖」と称する。

[0044] 本明細書において「逆転写活性」とは、RNA鎖を鋳型として該RNA鎖に相補的なDNA鎖を合成することができる活性のことをいう。

[0045] (1) 本発明の標的核酸の増幅方法

本発明の方法は、キメラオリゴヌクレオチドプライマー及びラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ少なくとも1種類使用し、さらにRNaseHおよびDNAポリメラーゼを組み合わせて実施することができる。また、RNaseH活性を有するDNAポリメラーゼをRNaseH活性が発現するような条件で使用する事ができる。

[0046] 本発明の方法により、等温条件下において、連続的に核酸が増幅される。ここで、「連続的に」とは、反応温度、反応液組成の変更を伴わずに反応が進行していることを意味する。また、「等温」とは、酵素および核酸鎖が下記各工程において機能する、実質的に一定の温度条件のことを意味する。

[0047] 本発明の標的核酸の増幅方法の一態様としては、

- (a) 鋳型となる核酸をデオキシリボヌクレオチド3リン酸、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼ、及び少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーで処理し、逆転写産物を得る工程、
- (b) 上記逆転写産物を鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseHを混合して反応混合物を調製する

工程、および、

(c) 上記DNAポリメラーゼによる伸長鎖合成反応及び鎖置換反応、並びにRNase Hによる伸長鎖の切断反応が行える一定の温度条件でラダー状増幅産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、を包含することを特徴とする核酸の増幅方法が例示される。

ここで、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されており、

上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に相補的な第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型となる核酸の塩基配列に相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2種類を含んでおり、

上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域およびその領域より3'側の塩基配列に相補的であり、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに上流領域(すなわち、5'側方向の領域)に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を5'側に有する。

[0048] また、本発明の別態様としては、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼ、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseHを混合して反応混合物を調製する工程、および、

(b) 鋳型となる核酸へのプライマーの特異的なアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長鎖合成反応及び鎖置換反応、並びにRNaseHによる伸長鎖の切断反応が行える一定の温度条件でラダー状増幅産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法が例示される。

ここで、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオ

チド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されており、

上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に相補的な第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型となる核酸の塩基配列に相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2種類を含んでおり、

上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域およびその領域より3'側の塩基配列に相補的であり、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに上流領域(すなわち、5'側方向の領域)に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を5'側に有する。

[0049] さらに本発明の別態様としては、

(a)鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseHを混合して反応混合物を調製する工程、および、

(b)鋳型となる核酸へのプライマーの特異的なアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長鎖合成反応及び鎖置換反応、並びにRNaseHによる伸長鎖の切断反応が行える一定の温度条件でラダー状増幅産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法が例示される。

ここで、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されており、

上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に相補的な第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型となる核酸の塩基配列に相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2種類を含んでおり、

上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該第一キメラ

オリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域およびその領域より3'側の塩基配列に相補的であり、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに上流領域(すなわち、5'側方向の領域)に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を5'側に有する。

[0050] 上記態様において、鋳型となる核酸が1本鎖の場合、第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、当該鎖に相補的な塩基配列を有する。また、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、当該鎖の相補鎖に相補的、即ち当該鎖に相同的な塩基配列を有する。さらにラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、当該鎖に相補的な塩基配列及び当該鎖に相同な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端よりさらに上流領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を5'側に有する。また、鋳型となる核酸が2本鎖の場合でも、いずれか一方の鎖において同様にプライマーを設計することができることは言うまでもない。

[0051] 上記態様のいずれにおいても、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーをキメラオリゴヌクレオチドプライマーに置き換えても良く、この場合ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの機能を当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーが補うことができる。すなわち、ラダー形成に寄与することができるならば、オリゴヌクレオチドプライマー及び／又はキメラオリゴヌクレオチドプライマーのいずれもが好適に使用できる。

特に限定はされないが例えば、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとして第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。この場合、第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端よりさらに上流領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を5'側に有している。

[0052] 当該方法では、伸長反応の基質となるヌクレオチド3リン酸としてPCR法等に使われるdNTP、すなわちdATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物が好適に使用できる。また、dUTPを基質として用いてもよい。さらに、当該dNTPは、使用されるDNAポ

リメラーゼの基質となる限りにおいては、dNTP(デオキシリボヌクレオチド3リン酸)のアナログ、たとえば7-デアザ-dGTP、dTTP等のヌクレオチド3リン酸を含んでいてもよい。また、dNTPあるいはdNTPアナログの誘導体を使用してもよく、官能基を有する誘導体、例えばアミノ基を有するdUTPを含んでいてもよい。当該方法では、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するが、当該プライマーは、例えば、DNA合成機等を用いて通常の合成方法と同様に調製することができる。

[0053] 本発明の方法において鋳型となる核酸、すなわちDNAまたはRNAは、当該核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から調製、あるいは単離したものでもよい。さらに、上記試料を直接、本発明の核酸増幅反応に使用してもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織(例えば、癌組織、リンパ節等)、細胞培養物(例えば、哺乳動物細胞培養物、細菌培養物等)のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料(食品、生物学的製剤等)、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破碎物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに上記試料中に含まれる核酸が公知方法で増幅されたDNAあるいはRNA等の核酸等も好適に使用できる。

[0054] これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である(例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき)。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施される。

[0055] RNA由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該RNAを鋳型とした逆転写反応によって合成されたcDNAを鋳型として本発明の方法を実施すればよい。

本発明の方法に適用することができるRNAには、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全RNAの他、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子種が挙げられる。

[0056] 上記の逆転写反応に使用される酵素としては、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素(AMV RTase)、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素(M-MLV RTase)、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素(RAV-2 RTase)等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ(Tth DNAポリメラーゼ等)、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼが好ましく、B. st由来DNAポリメラーゼ(Bst DNAポリメラーゼ)、さらにBca DNAポリメラーゼが好ましい。例えば、Bca DNAポリメラーゼは、逆転写反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鋳型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することができる。上記の逆転写酵素活性を有する酵素も、当該活性を有している範囲において天然体、変異体のいずれもが使用できる。

[0057] 本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、特に限定するものではないが、好ましくは約6ー約50塩基、さらに好ましくは約10ー約40塩基、特に好ましくは約12ー約30塩基のオリゴヌクレオチドが本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーとして使用される。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。該プライマーは、後に示す段階で使用されるRNaseHにより認識される配列を3'末端又は3'末端側に含む。

[0058] 本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドを本発明のDNA合成方法にプライマーとして使用することができる。

一般式: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(上記一般式において、dN:デオキシリボヌクレオチド及び/又はヌクレオチドアナロ

グ、N:未修飾リボヌクレオチド及び/又は修飾リボヌクレオチド、なお上記の各ヌクレオチドはその機能を損なわない範囲でヌクレオチドのアナログや誘導体(修飾ヌクレオチド)を含有していてもよく、dNa部位の一部のdNはNで置換されていてもよい。)

上記一般式において、特に限定はされないが、例えば、aは5以上の整数であればよく、好ましくは6以上の整数、さらに好ましくは8以上の整数である。また、bは1以上の整数であればよく、例えば1-15の範囲、好ましくは1-10の範囲、さらに好ましくは1-7の範囲、特に好ましくは1-5の範囲である。さらにcは0であってもよく、あるいは1以上の整数であり、好ましくは0-5の範囲、さらに好ましくは0-3の範囲である。

- [0059] 本発明の方法において、ラダー状増幅産物を得るためにラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを使用しても良く、当該プライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドあるいはヌクレオチドアナログから選択されるものが好適に使用できる。
- [0060] 本発明の方法において使用されるラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列あるいは当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端よりさらに上流領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を5'側に付加されたものが好適に使用できる。
- [0061] 本発明において、RNAを鋳型とする場合には、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを逆転写プライマーとして使用しても良く、使用される反応条件において鋳型RNAにアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、特定の鋳型RNAに相補的な塩基配列を有するプライマー(特異的プライマー)の他、オリゴdT(デオキシチミン)プライマーやランダムな配列を有するプライマー(ランダムプライマー)であっても良い。当該ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーにおいて、鋳型となる核酸の塩基配列の一部と相補的な配列の部分の長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは9ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは30ヌクレオチド以下である。すなわち、RNAからの逆転

写反応に使用できるものであれば特に限定はない。

- [0062] 当該ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、使用される条件において、ラダー状DNA鎖の伸長に寄与することができるものであれば特に限定はされない。当該プライマーは、鋳型となる核酸と相同的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列あるいは当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端よりさらに上流領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な塩基配列を有しているものが好ましく、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域と相補的な配列は、特に何ら限定するものではないが、好ましくは約3〜約100ヌクレオチド、さらに好ましくは約4〜約50ヌクレオチド、特に好ましくは約5〜約20ヌクレオチドの塩基長である。
- [0063] また、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域と相補的な配列は、特に何ら限定するものではないが、+20〜100位置から選択される3塩基以上の配列、好ましくは+15〜80位置から選択される3塩基以上の配列、さらに好ましくは+10〜60位置から選択される3塩基以上の配列、特に好ましくは+5〜40位置から選択される3塩基以上の配列である。当該塩基配列としては、特に限定はされないが例えば、−1位置、−11位置、−21位置から始まる領域が挙げられる。
- [0064] 当該ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、その機能を発揮できる限り、アニーリングする位置は特に何ら限定はなく、キメラオリゴヌクレオチドプライマーと全てもしくは1塩基以上重複する位置、隣接する位置、1〜40塩基離れた位置のいずれでもよい。
- [0065] また、当該ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのGC含量は、特に限定はされないが、40%以上の範囲が好適である。
- [0066] さらに本発明の方法において使用されるラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、ヌクレオチドアナログやその他の物質を含有するものであってもよい。すなわち、本発明のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーには、DNAポリメラーゼがその3'末端からポリメラーゼ伸長反応せしめる、プライマーの機能を失わない範囲で1以上のヌクレオチドアナログを含有させることができ、さらに、当該ヌクレオチドアナログは複数の種類のものを組合せて使用することができる。該ヌクレオチドアナログとしては、特に限定はされないが、例えば、デオキシイノシンヌクレオチド、デオキシウラシルヌ

クレオチドあるいは7-デアザグアニンのような修飾塩基を有するヌクレオチドアナログ、リボースの誘導体を有するヌクレオチドアナログ等を使用することができる。また、本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、上記の機能を保持する範囲内で種々の修飾、例えば標識化合物等の付加、あるいは、固定化用の官能基の付加がなされたデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログを含有してもよい。

ヌクレオチドアナログのプライマーへの導入は、プライマー自身の高次構造形成の抑制、鋳型とのアニーリング形成の安定化の観点からも有効である。

[0067] 本発明の方法で用いられるキメラオリゴヌクレオチドプライマーおよびラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド バイオシステムズ社(ABI社、Applied Biosystems Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

[0068] さらに本発明の別態様としては、

鋳型となる核酸に本来存在している塩基配列を利用してラダー状増幅産物を得ることができる。この場合ラダー形成は、鋳型となる核酸上にある塩基配列を利用して実施することができる。特に限定はされないが例えば、設定しようとする一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側あるいはその上流にある塩基配列が、設定しようとするもう一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側あるいはその上流にある塩基配列と相補的である場合、上記配置でキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設定することにより、効率よくラダー状増幅産物を得ることができる。また、ラダー形成を行うことにより、検出感度および検出速度が向上する。

[0069] 上記鋳型となる核酸上の双方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側あるいはその上流にある、相補的な塩基配列は、そのGC含量、その近接する配列、プライマーとの距離、増幅される長さ、反応条件等によって任意に設定することができ、特に限定するものではないが、例えば3塩基以上、好ましくは6塩基以上の相補的な塩基配列から選択することが好ましい。また当該配列は、特に限定するものではないが、

例えば上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端を0位とした場合、+20〜100の領域、好ましくは+15〜80の領域、さらに好ましくは+10〜60の領域、特に好ましくは+5〜40の領域である。

さらに鋳型となる核酸上の双方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側、あるいはその上流にある相補的な配列は、そのGC含量、その近接する配列、プライマーとの距離、増幅される長さ、反応条件等によって任意に設定することができ、特に限定するものではないが、70%の以上の相補性の範囲が好適である。

[0070] 本発明の方法で使用されるラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを何ら限定するものではないが、後述の実施例にて用いているラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの構成を例として説明する。

[0071] 例えば、A12-205R(配列表の配列番号3)の1〜12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より1〜12塩基上流領域(−1〜−12)に相補的な塩基配列であり、さらに13〜30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)と相補的な領域に相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な配列である。

[0072] 例えば、A12-215R(配列表の配列番号5)の1〜12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より1〜12塩基上流領域(−1〜−12)に相補的な塩基配列であり、さらに13〜30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜30番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A12-215Rの23〜30番目の塩基は205RN3(18)の1〜8番目の塩基と重複している。

[0073] 例えば、A12-223R(配列表の配列番号5)の1〜12番目の塩基は第二キメラヌクレオチド(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より1〜12塩基上流領域(

ー1ー12)に相補的な塩基配列であり、さらに13ー30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)と相補的な領域より3'側18塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13ー30番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流18塩基目から上流1塩基目の配列と相同である。A12-223Rと205RN3(18)は隣接している。

[0074] 例えば、A12(-10)-215R(配列表の配列番号8)の1ー12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より11ー22塩基上流領域(-11ー-22)に相補的な塩基配列であり、さらに13ー30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13ー30番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A12(-10)-215Rの23ー30番目の塩基は205RN3(18)の1ー8番目の塩基と重複している。

[0075] 例えば、A12(-20)-215R(配列表の配列番号9)の1ー12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より21ー32塩基上流領域(-21ー-32)に相補的な塩基配列であり、さらに13ー30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13ー30番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A12(-20)-215Rの23ー30番目の塩基は205RN3(18)の1ー8番目の塩基と重複している。

[0076] 例えば、A12(6)-215R(配列表の配列番号10)の1ー12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端側6塩基(+5ー0)および5'末端より1ー6塩基上流領域(-1ー-6)に相補的な塩基配

列であり、さらに13〜30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜30番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A12(6)−215Rの23〜30番目の塩基は205RN3(18)の1〜8番目の塩基と重複している。

[0077] 例えば、A12(12)−215R(配列表の配列番号11)の1〜12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端側12塩基(+11〜0)に相補的な塩基配列であり、さらに13〜30番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜30番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A12(12)−215Rの23〜30番目の塩基は205RN3(18)の1〜8番目の塩基と重複している。

[0078] 例えば、A6(−10)−215R(配列表の配列番号14)の1〜6番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より11〜16塩基上流領域(−11〜−16)に相補的な塩基配列であり、さらに7〜24番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該7〜24番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A6(−10)−215Rの17〜24番目の塩基は205RN3(18)の1〜8番目の塩基と重複している。

[0079] 例えば、A9(−10)−215R(配列表の配列番号15)の1〜9番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(134FN3(18);配列表の配列番号7)の5'末端より

11～19塩基上流領域(－11～－19)に相補的な塩基配列であり、さらに10～27番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(205RN3(18);配列表の配列番号2)の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該10～27番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基の配列と相同である。A9(－10)～215Rの20～27番目の塩基は205RN3(18)の1～8番目の塩基と重複している。

[0080] 例えば、(A12)241RN3(配列表の配列番号19)の1～7番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(160FN3;配列表の配列番号17)の5'末端より1～7塩基上流領域(－1～－7)に相補的な塩基配列であり、さらに8～21番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(241RN3;配列表の配列番号18)と相補的な領域に相補的な配列である。言い換えれば、当該8～21番目の塩基は、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同である。

[0081] 例えば、ALDH2-TH1(配列表の配列番号25)の1～12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(ICAN-ALDH2-F;配列表の配列番号21)の5'末端より1～12塩基上流領域(－1～－12)に相補的な塩基配列であり、さらに13～29番目の塩基は鋳型とある核酸の第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(ICAN-ALDH2-R;配列表の配列番号22)の5'側15塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側2塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流2塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側15塩基の配列と相同である。ICAN-ALDH2-Rの2～16番目の塩基はALDH2-TH1の15～29番目の塩基と重複している。

[0082] 例えば、ALDH2-TH2(配列表の配列番号26)の1～12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(ICAN-ALDH2-F;配列表の配列番号21)の5'末端より1～12塩基上流領域(－1～－12)に相補的な塩基配列であり、さらに13～29番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(ICAN-ALDH2-R;配列表

の配列番号22)の5'側6塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜29番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側6塩基の配列と相同である。ICAN-ALDH2-Rの2〜7番目の塩基はALDH2-TH2の23〜28番目の塩基と重複している。

[0083] 例えば、ALDH2-TH3(配列表の配列番号27)の1〜12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(ICAN-ALDH2-F;配列表の配列番号21)の5'末端より1〜12塩基上流領域(−1〜−12)に相補的な塩基配列であり、さらに13〜28番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(ICAN-ALDH2-R;配列表の配列番号22)と相補的な配列より2〜17塩基3'側の塩基配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜28番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流2〜17塩基目の配列と相同である。

[0084] 例えば、R2(−13)A12-1(配列表の配列番号35)の1〜12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(F2;配列表の配列番号31)の5'末端より1〜12塩基上流領域(−1〜−12)に相補的な塩基配列であり、さらに13〜29番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(R2;配列表の配列番号32)と相補的な配列より13〜29塩基3'側の塩基配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜29番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流13〜29塩基目の配列と相同である。

[0085] 例えば、R2(−13)A12-2(配列表の配列番号36)の1〜12番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー(F2;配列表の配列番号31)の5'末端より13〜24塩基上流領域(−13〜−24)に相補的な塩基配列であり、さらに13〜29番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー(R2;配列表の配列番号32)と相補的な配列より13〜29塩基3'側の塩基配列と相補的な配列である。言い換えれば、当該13〜29番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流13〜29塩基目の配列と相同である。

[0086] 例えば、A6-215R(配列表の配列番号47)の1〜6番目の塩基は第二キメラオリゴ

ヌクレオチドプライマー (B134FN3; 配列表の配列番号12) の5'末端より1〜6塩基上流領域(−1〜−6)に相補的な塩基配列であり、さらに7〜24番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー (205RN3(16); 配列表の配列番号13) の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的である。言い換えれば、当該7〜24番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基と相同である。205RN3(16)の1〜8番目の塩基はA6-215Rの17〜24番目の塩基と重複している。

[0087] 例えば、A9-215R (配列表の配列番号48) の1〜9番目の塩基は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー (B134FN3; 配列表の配列番号12) の5'末端より1〜9塩基上流領域(−1〜−9)に相補的な塩基配列であり、さらに10〜27番目の塩基は第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー (205RN3(16); 配列表の配列番号13) の5'側8塩基と相補的な領域および当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域より3'側10塩基の配列と相補的である。言い換えれば、当該7〜24番目の塩基は当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流10塩基目から当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側8塩基と相同である。205RN3(16)の1〜8番目の塩基とA6-215Rの20〜27番目の塩基が重複している。

[0088] 実施例2-(1)-(A)にて使用している第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマー、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの位置関係を例として図1に示す。

[0089] 本発明の方法で用いられるRNaseHは、常温性から耐熱性のRNaseHのいずれもが好適に本発明に使用できる。例えば、下記実施例に示すように、国際公開第02/22831号パンフレット 実施例8記載の方法で調製された*Thermococcus litoralis*由来のRNaseHIII(以下、Tli RNaseHIIIと称す)や同パンフレット 実施例7記載の方法で調製された*Archaeoglobus fulgidus*由来のRNaseII(以下、Afu RNaseHIIIと称す)が本発明の方法に使用することができる。該耐熱性RNaseHとしては、特に限定はされないが、例えば市販のHybridaseTM Thermostable RNaseH(Epicentre Biotechnologies社製)の他、好熱性バチルス(*Bacillus*)属細菌、サ

ーマス(Thermas)属細菌、ピロコッカス(Pyrococcus)属細菌、サーモトガ(Thermotoga)属細菌、アルカエオグロバス(Archaeoglobus)属細菌等由来のRNaseH等も好適に使用できる。さらに、該RNaseHは、天然体および変異体のいずれもが好適に使用できる。

- [0090] 本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、上記の鎖置換活性を有するものであれば特に限定はなく、例えば、バチルス カルドテナックス(*Bacillus caldotenax*、以下、*B. ca*と称す)やバチルス ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*、以下*B. st*と称す)等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌(以下、*E. coli*と称す)由来のDNAポリメラーゼIのラージ フラグメント(クレノウ断片)等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性から耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。

*B. ca*は生育至適温度が約70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来のBca DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性(逆転写活性)、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。上記の酵素は、その本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換えタンパク質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたBca DNAポリメラーゼであるBcaBEST DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)等が挙げられる。また、該酵素は、日本特許第2978001号に記載の方法によって、該公報記載の微生物より調製することもできる。

- [0091] なお、DNAポリメラーゼの中には、特定の条件でエンドヌクレアーゼ活性、例えば、RNaseH活性を有するものが知られている。このようなDNAポリメラーゼを本発明の方法に用いることができる。すなわち、該DNAポリメラーゼをRNaseH活性が発現されるような条件下、例えば Mn^{2+} の存在下で使用する態様が挙げられる。該態様においては、上記RNaseHを添加することなく本発明の方法を実施することができる。すなわち、 Mn^{2+} を含有する緩衝液中で上記のBca DNAポリメラーゼがRNaseH

活性を示すことができる。なお、上記の態様はBca DNAポリメラーゼに限定されるものではなく、RNaseH活性を併せ持つことが知られている公知のDNAポリメラーゼ、例えばサーマス サーモフィラス(Thermus thermophilus)由来のTth DNAポリメラーゼも本発明に使用することができる。

[0092] 本発明の方法において、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを使用する場合ならびに第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーが当該ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの機能を兼ねる場合、さらに鋳型となる核酸上にある相補的な塩基配列を利用してラダー状増幅産物を得る場合のいずれにおいても、当該反応にランダムプライマーを共存させることにより、反応が安定し効率よく目的の増幅産物を得ることができる。上記ランダムプライマーには特に限定はないが、例えば6塩基〜9塩基長のランダムプライマーが好適に使用できる。

[0093] (2) 本発明の組成物

本発明は、前述の本発明の核酸の増幅方法、または本発明の核酸の検出方法に使用される組成物を提供する。該組成物としては、例えば、上記(1)に記載のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー及び／又はキメラオリゴヌクレオチドプライマー、RNaseH、ならびにDNAポリメラーゼを含有するものが挙げられる。さらに、増幅反応を行うための成分として、緩衝成分やマグネシウム塩、dNTP等を含んでもよい。さらに、修飾されたデオキシリボヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチド3リン酸のアナログを含有していてもよい。さらに、緩衝成分やその他の添加物を使用することができる。

[0094] 特に好適な態様としては、本発明の核酸増幅方法に適した組成で上記の各種成分が含有された組成物を挙げることができ、該組成物は適切な鋳型とキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを添加するのみで増幅反応を実施することができる。さらに、増幅対象があらかじめ明らかである場合には、当該増幅対象の増幅に適したキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物が好適である。

[0095] (3) 本発明のキット

本発明は、前述の本発明の核酸の増幅方法に使用されるキットを提供する。1つの

実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるDNAポリメラーゼ、RNaseH、キメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、RNaseHならびに鎖置換反应用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼおよび／またはRNaseHを指示書に従って選択し、使用してもよい。さらに、RNAを鋳型とする場合の逆転写反应用試薬を含んでもよい。DNAポリメラーゼは、上記(1)記載の本発明に使用されるDNAポリメラーゼから選択することができる。また、RNaseHは、上記(1)記載のRNaseHから選択することができる。

- [0096] 上記「指示書」とは、当該キットの使用法、例えば鎖置換反应用試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。
- [0097] さらに、本発明のキットにおいては、Bicine、Tricine、HEPES、リン酸塩あるいはtris-塩酸緩衝成分を含有する反応バッファー、及びアニーリング溶液が含まれていてもよい。また、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼやRNaseHが含まれていてもよい。さらに、修飾されたデオキシリボヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチド3リン酸のアナログを含有していてもよい。
- [0098] さらに、標的核酸の検出方法に使用されるキットは、上記の指示書、増幅反応のための試薬類の他、標的核酸の増幅に適したキメラオリゴヌクレオチドプライマー及びラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。
- [0099] (4) 本発明の標的核酸の検出方法

本発明の核酸の増幅方法を使用することにより、試料中の標的核酸の検出を行うことができる。当該検出方法の一態様としては、

(a) 上記(1)記載の本発明の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；お

よび、

(b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；

を包含する検出方法が挙げられる。

- [0100] 上記(a)行程において、RNAを鋳型とする場合は、逆転写反応と核酸増幅反応を1段階もしくは2段階で行ってもよい。特に限定はされないが、逆転写酵素と鎖置換型DNAポリメラーゼの組み合わせとして例えば、AMV RTase、M-MLV RTaseあるいはRAV-2 RTaseとBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好適に使用できる。あるいは、逆転写活性と鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを使用しても良く、例えばBcaBEST DNAポリメラーゼが好適に使用できる。
- [0101] さらに、本発明の標的核酸の検出方法により、点突然変異、一塩基置換(Single nucleotide polymorphysm, SNP)のような遺伝子上の特定の塩基についての情報を得ることが可能である。この態様においては、使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端部分が、標的とされる塩基配列の判別しようとする特定の塩基付近に位置するようにすればよい。
- [0102] さらに、本発明の検出方法では、Bicine、Tricine、HEPES、リン酸塩あるいはtris緩衝成分を含有する反応バッファー、及びスぺルミジンやプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液の使用により、微量の核酸試料からもさらに高感度に標的核酸を検出することができる。この場合、使用するRNaseHとDNAポリメラーゼは特に限定はされないが、例えばサーモコッカス属細菌由来のRNaseHIII及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好ましい。特に、上記RNaseH及びDNAポリメラーゼはともにその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には検出感度の向上あるいは増幅産物量の増加を指標にして、該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。
- [0103] 本発明の検出方法においては、標的核酸の増幅の際に、dUTPを基質として取り込ませることができる。したがって、dUTPを基質に用いた場合には、ウラシル N-グリコシダーゼ(uracil N-glycosidase:UNG)を利用して増幅産物を分解し、増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することができる。
- [0104] 上記(b)工程には公知の核酸検出方法、例えば電気泳動により特定のサイズの反

応産物を検出する方法や、スマートサイクラー(タカラバイオ社製)、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)等を用いたリアルタイム検出、プローブとのハイブリダイゼーションによる検出等を使用することができる。また、磁気ビーズ等を組み合わせた検出方法も好適に使用できる。さらに、標的核酸の増幅工程時に生成するピロリン酸をマグネシウム塩のような不溶性物質とさせて反応液を白濁させ、その濁度を測定しても良い。

上記電気泳動による検出には、通常、エチジウムブロマイド等の蛍光物質が使用されるが、プローブとのハイブリダイゼーションを組み合わせてもよい。また、プローブは放射性同位元素による標識の他、ビオチンや蛍光物質のような非放射性的の標識を施したものが使用できる。リアルタイム検出を行う際、サイバーグリーン(タカラバイオ社製)の発色用試薬が好適に使用できる。この他、上記(a)工程において標識ヌクレオチドを使用することにより、増幅産物に標識ヌクレオチドを取り込ませて検出を容易にすることや該標識を利用した検出用シグナルの増強を行うことができ、さらに蛍光偏光法、蛍光エネルギー転移等を利用した検出を行うことも可能である。さらに、適切な検出系を構築することにより、標的核酸を自動的に検出することや、あるいは標的核酸の定量を行うことが可能である。また、ハイブリッドクロマト法による肉眼検出法も好適に使用できる。

- [0105] 消光状態になるような距離で配置された2種類以上の蛍光物質で標識されたりボヌクレオチド(RNA)プローブあるいはリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドで構成されるキメラオリゴヌクレオチドプローブのいずれもが本発明の検出方法に使用することができる。当該プローブは蛍光を発することはないが、これに相補的な標的核酸由来の増幅DNAにアニーリングした場合、RNaseHは該プローブを分解する。この結果、プローブ上の蛍光物質間の距離が増大して蛍光が発せられるようになり、標的核酸の存在を知ることができる。RNaseHを使用して本発明の核酸の増幅方法が実施された場合には、その反応液中に上記のプローブを添加するだけで標的核酸を検出することができる。当該プローブの標識に使用される蛍光物質としては、例えば、ROX(Applied Biosystems社製)やFAM(Applied Biosystems社製)、クエンチング物質としては、例えば、Eclipse(Epoch Biosciences社製)との組み

合わせが好適に使用できる。

[0106] 本発明で用いるプローブは、上記の本発明の核酸の増幅方法により増幅された核酸に通常のハイブリダイゼーションの条件において標的核酸にハイブリダイズし得るものであれば特に限定はないが、増幅産物を特異的に検出する観点からは、例えば厳密な条件として当業者に知られている条件でハイブリダイズするものが好ましい。前記、厳密なハイブリダイゼーション条件は、例えば1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス(T. Maniatis)ら編集、モレキュラー クローニング: ア ラボラトリー マニュアル第2版(Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.)に記載されている。具体的な厳密な条件としては、例えば以下の条件を挙げることができる。すなわち、0.5% SDS、5×デンハルト[Denhardt's, 0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400]及び100 μ g/mlサケ精子DNAを含む6×SSC(1×SSCは0.15 M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)中で、使用するプローブの T_m 値より約25℃低い温度で4時間ー晩保温を行う条件を言う。前記プローブは、標的核酸の検出を容易にするために上記のような標識を付されたものを使用することができる。

[0107] 本発明の標的核酸の検出方法においては、増幅領域が連なったラダー状増幅産物を積極的に生成させる。このようなラダー状増幅産物は増幅領域が複数個、任意の塩基配列を介していずれも同じ向きに重合したものであり、電気泳動による増幅産物の解析ではラダー状のバンドとして確認される。当該ラダー状増幅産物の生成は、増幅される領域、該領域のサイズ、その隣接領域、使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列あるいは反応の条件等により調整することができる。

[0108] 本発明の検出方法においては、上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー及び／又はキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができ、増幅領域が連なった重合体を生成する。このようなラダー状増幅産物は、複数個の増幅領域がラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーと第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側あるいはその上流領域に相補的な配列を介して同じ向きに連なったものである。さらに

本発明の方法においては、鋳型となる核酸上の一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側あるいはその上流にある塩基配列がもう一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側あるいはその上流にある塩基配列と相補的な場合、当該位置にキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設定することにより、標的核酸を感度良く検出することができる。

[0109] さらに上記ラダー状増幅産物は、増幅領域を複数個含むものであるので、例えば適切なプローブとのハイブリダイゼーションによって多数のプローブとハイブリダイズすることができる。当該プローブとしては、標的核酸の塩基配列及び／又は上記ラダー状増幅産物中の標的核酸配列間に存在する介在配列にハイブリダイズするもののいずれもが好適に使用できる。その結果、強いシグナルを発生することから、増幅領域を含む核酸の検出を目的とする場合に有用である。また、制限酵素消化等を組み合わせて、ラダー状増幅産物より増幅領域、またはその一部をモノマーとして得ることもできる。

[0110] 本発明の核酸の増幅方法の等温下における増幅方法においては、サーマルサイクラーのような装置を必要としない。dNTPのような試薬もPCR等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。さらに、本発明の方法はPCR法よりも短時間により多くの増幅産物を得られることから、簡便、迅速、高感度な遺伝子検出方法として利用することができる。

実施例

[0111] 以下の実施例により、さらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に何ら限定されるものではない。

[0112] 参考例1

実施例における耐熱性RNaseHのunit数は、以下の方法により算出した。

ポリ(rA)及びポリ(dT) (ともにアマシヤム バイオテック社製) 1mgをそれぞれ1mM EDTAを含む40mM tris-HCl(pH7. 7) 1mlに溶解し、ポリ(rA)溶液及びポリ(dT)溶液を調製した。

次に、20mM HEPES-KOH(pH7. 8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチル

スルホキンド、0.01%BSAに、終濃度 $30\mu\text{g/ml}$ となるポリ(rA)溶液、終濃度 $20\mu\text{g/ml}$ となるポリ(dT)溶液を加え、 37°C で10分間保持後、室温冷却した後、1/100容量の400mM 酢酸マグネシウムを加えてポリ(rA)–ポリ(dT)溶液を調製した。

このポリ(rA)–ポリ(dT)溶液 $800\mu\text{l}$ に、任意に希釈した酵素液 $8\mu\text{l}$ を加え、 40°C で20分間反応させ、吸光度(A260)を経時的に測定し、その変化量を求めた。すなわち、酵素反応によって、ポリ(rA)–ポリ(dT)ハイブリッドから遊離したヌクレオチドの濃度を吸光度差から求めた。RNaseHの1単位は、1nmolのリボヌクレオチドが遊離するのに相当するA260を20分間に増加させる酵素量とし、下記の式に従って算出した。

単位(unit) = 1分あたりの吸光度の変化量 $\times 57.1 \times$ 希釈率

[0113] 実施例1

(1) 鋳型RNAの調製

RT-ICANの鋳型として使用したRNA transcriptは、in vitro transcriptionによって合成した。

まず、in vitro transcriptionの鋳型となるプラスミドDNAを人工合成遺伝子作製受託サービス(タカラバイオ社)に依頼して合成した。配列は、SARS(重症急性呼吸器症候群; Severe Acute Respiratory Syndrome)コロナウイルスゲノム配列(GenBank Acc. No. :AY278741)の18133番目~18362番目(配列表の配列番号1)を用いた。プラスミドに挿入するため、該配列の5'末端にHindIII認識配列を、3'末端にBamHI認識配列を付加した。この断片をpBluescriptII SK(+)のHindIII、BamHIサイトに挿入した。得られたプラスミドをBamHIで切断して直鎖DNAとし、T7 RNA polymeraseによるin vitro transcriptionの鋳型とした。

in vitro transcriptionには、MEGAscript T7 Kit(Ambion社製)を用いた。キットに添付されている取扱説明書に従って、in vitro transcription、DNaseI処理、RNAの精製を行い、合成されたRNAの濃度をOD260により測定した。このRNA溶液をRNA Dilution Buffer(10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA、10mM NaCl、 $30\mu\text{g/ml}$ E. coli 16S+23S rRNA(Boehringer Inger

heim社製))にて 10^0 – 10^5 コピー/ μ lに濃度調整し、RT-ICANの鋳型として用いた。

[0114] (2) 2step RT-ICANの検討

(A) 検討1

逆転写プライマーの5'末端に第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする配列を付加することによる効果について検討した。

[0115] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(–1–12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを逆転写プライマーとして使用することによるRT-ICANの感度、検出速度の変化を見た。

上記実施例1–(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、 1μ lあたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。最終濃度32mM HEPES–KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、上記逆転写プライマーとして205RN3(18)プライマー(配列表の配列番号2)、A12–205Rプライマー(配列表の配列番号3)、215Rプライマー(配列表の配列番号4)、A12–215Rプライマー(配列表の配列番号5)あるいは、A12–223Rプライマー(配列表の配列番号6) 各1pmol、RTase M–MLV(タカラバイオ社製) 12.5U、 1μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加した10 μ lの反応液を調製した。

[0116] 該反応液はサーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)にセットし、45℃、10分間保持後、4℃に冷却した。逆転写反応終了後、該反応液10 μ lに最終濃度32mM HEPES–KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの134FN3(18)プライマー(配列表の配列番号7)と第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(18)プライマー 各25pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、国際公開第02/22831号パンフレット 実施例8に記載の方法で調製したTli RNaseHIII 0.05U、サイバーグリーン(タカラバイオ社製)を含む反応液15 μ lを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により55℃でICAN反応を行い、増幅産物をリアルタイムで検出した。また

、反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

[0117] その結果、205RN3(18)プライマーで逆転写したRT-ICANの感度が 10^4 コピーであるのに対し、同じ位置で第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加した逆転写プライマーA12-205Rを用いた場合、感度は 10^2 コピーとなり、感度が2桁向上した。また、 10^5 コピーの検出速度も約2分速くなった。

[0118] 同様に、215R DNAプライマーで逆転写したRT-ICANの感度が 10^3 コピーであるのに対し、同じ位置で第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー A12-215Rプライマーを逆転写に用いた場合、感度は 10^0 コピーとなり、感度が3桁向上した。また、 10^5 コピーの検出速度も約2分速くなった。

[0119] また、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー A12-223Rを逆転写に用いた場合の感度も 10^1 コピーであった。

[0120] 以上のことから、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを逆転写に用いることにより、当該プライマーが鋳型RNAにアニールする位置にかかわらず、感度、検出速度の向上が認められた。

[0121] (B)検討2

ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加する、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域および/または該primerの一部にアニールする12塩基の位置(-1-12、-11-22、-21-32、+5-6、+11-0)を変え、逆転写プライマーとして使用することにより、同様の検討を行った。

まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、 $1\mu\text{l}$ あたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。

最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μM dNTPsに、上記逆転写プライマーとしてラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー 215

Rプライマー、A12-215Rプライマー、A12(-10)-215Rプライマー(配列表の配列番号8)、A12(-20)-215Rプライマー(配列表の配列番号9)、A12(6)-215R(配列表の配列番号10)、あるいは、A12(12)-215R(配列表の配列番号11) 各1pmol、RTase M-MLV(タカラバイオ社製) 50U、1 μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加した10 μ lの反応液を調製した。

[0122] 該反応液はサーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)にセットし、45℃、10分間保持後、4℃に冷却した。逆転写反応終了後、該反応液10 μ lに最終濃度32 mM HEPES-KOH緩衝液(pH7. 8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0. 11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーのB134FN3(16)プライマー(配列表の配列番号12)と第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(16)プライマー(配列表の配列番号13) 各25pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHIII 0. 05U、サイバーグリーン(タカラバイオ社製)を含む反応液15 μ lを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により55℃でICAN反応を行い、増幅産物をリアルタイムで検出した。また、反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

[0123] その結果、上記215Rプライマーで逆転写したRT-ICANの感度が 10^2 コピーであるのに対し、同じ位置で第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1〜-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12-215Rを用いた場合、感度は 10^1 コピーとなり、感度が1桁向上した。また、 10^5 コピーの検出速度も約3分速くなった。

[0124] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-11〜-22)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12(-10)-215Rを用いた場合の感度は 10^2 コピーで、215Rプライマーの場合と同じであったが、 10^5 コピーの検出速度は約2分速くなった。また、 10^2 コピーから 10^5 コピーの検出は、215Rプライマーの場合に比べて定量性(相関係数0. 997)がみられた。

[0125] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-21〜-32)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12(-20)-2

15Rを用いた場合、感度は 10^1 コピーとなり、感度が1桁向上した。また、 10^5 コピーの検出速度も約2.5分速くなった。

[0126] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域および該primerの一部にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12(6)-215R、および第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの一部にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12(12)-215Rを用いた場合も、上記プライマーと同様に検出感度、検出速度共に向上した。

[0127] 以上のことから、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする12塩基の配列の位置を変えて5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのいずれにおいても、感度、検出速度の向上が認められた。

[0128] (C) 検討3

ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加する、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする塩基の長さを6塩基、9塩基、12塩基(-11-16、-11-19、-11-22)とした逆転写プライマーを用いて、RT-ICANの感度、検出速度を検討した。

まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、 $1\mu\text{l}$ あたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。

最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μM dNTPsに、上記逆転写プライマーとしてラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの215Rプライマー、A6(-10)-215Rプライマー(配列表の配列番号14)、A9(-10)-215Rプライマー(配列表の配列番号15)、あるいは、A12(-10)-215Rプライマー各1pmol、RTase M-MLV(タカラバイオ社製) 50U、 $1\mu\text{l}$ の各コピー数の鋳型RNAを添加した $10\mu\text{l}$ の反応液を調製した。

[0129] 該反応液はサーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)にセットし、45℃、10分間保持後、4℃に冷却した。逆転写反応終了後、該反応液 $10\mu\text{l}$ に最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μM dNTPsに、第二キ

メラオリゴヌクレオチドプライマーのB134FN3(16)プライマーと第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(16)プライマー 各25pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHIII 0.05U、サイバーグリーンを含む反応液15 μ lを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により55°CでICAN反応を行い、増幅産物をリアルタイムで検出した。また、反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

[0130] その結果、215Rプライマーで逆転写したRT-ICANの感度が 10^3 コピーであるのに対し、同じ位置で第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-11~-16)にアニールする6塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA6(-10)-215Rを用いた場合、感度は 10^2 コピーとなり、感度が1桁向上した。また、 10^5 コピーの検出速度も約1分速くなった。

[0131] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-11~-19)にアニールする9塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA9(-10)-215Rを用いた場合の感度は 10^1 コピーとなり、感度が2桁向上した。また、 10^5 の検出速度も約2.5分速くなった。

[0132] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-11~-22)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12(-10)-215Rを用いた場合、感度は 10^1 コピーとなり、感度が2桁向上した。また、 10^5 の検出速度も約3分速くなった。

[0133] 以上のことから、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする塩基の数を変えて5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーにおいて、6塩基以上の付加で、感度、検出速度の向上が認められた。その効果は第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする塩基の数が多いほど大きいことが確認できた。

[0134] (D)検討4

第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1~-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12-215Rを用いた、RT-ICANの検出速度、定量性について検討した。

まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。

最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、A12-215Rプライマー 1pmol、RTase M-MLV(タカラバイオ社製) 50 U、1 μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加した10 μ lの反応液を調製した。

- [0135] 該反応液はサーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)にセットし、45°C、10分間保持後、4°Cに冷却した。逆転写反応終了後、該反応液10 μ lに最終濃度32 mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、500 μ M dNTPsに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーのB134FN3(16)プライマーと第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(16)プライマー 各25pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHIII 0.05U、サイバーグリーンを含む反応液15 μ lを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により55°CでICAN反応を行い、増幅産物を1サイクル(1分)毎にリアルタイムで検出した。
- [0136] 増幅曲線を図2に示す。図2に示したように、 10^1 ~ 10^5 コピーが定量的(相関係数0.992)に検出され、10サイクル以内に10コピーまでの反応の立ち上がりが確認できた。
- [0137] さらに、クロマトストリップへの展開による、プローブハブリダイゼーション法でも増幅産物の確認を行った。
- [0138] クロマトストリップへの展開による、プローブハブリダイゼーション法での増幅産物の確認は、TaKaRa Bed-Side ICAN bla^{IMP} Detection Kit(タカラバイオ社製)に含まれるDetection Setを用い、その取扱説明書に記載されている検出方法に従って行った。ただし、今回の検出では、プローブとしてFITC標識プローブSARS-BNI-B(配列表の配列番号16)を含むProbe Solutionを使用し、上記キットに含まれるblaMP Probe SolutionおよびIC Probe Solutionは使用しなかった。
- [0139] その結果、 10^0 ~ 10^5 コピー/反応の増幅産物により、赤紫色のラインの呈色が認められ特異的な増幅が確認出来た。

[0140] (3) 1step RT-ICANの検討

(A) 検討1

第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする配列を付加し、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとして使用することによる効果について検討した。

- [0141] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-7)にアニールする7塩基を第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加することによるRT-ICANの感度、検出速度について検討した。第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に7塩基付加することで、第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端から12塩基が第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-12)にアニールする配列となる。逆転写反応とICAN反応は同一チューブ内で同時に行った。

まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり100、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵コピーに調製した。最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%B SA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの160FN3プライマー(配列表の配列番号17)と第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの241RN3プライマー(配列表の配列番号18)あるいは第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの(A12)241RN3プライマー(配列表の配列番号19)各25pmol、RTase M-MLV(タカラバイオ社製) 50U、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHII 0.05U、サイバーグリーン(タカラバイオ社製)を含む反応液24 μ lに1 μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により45℃で5分、55℃で45分保持し、増幅産物をリアルタイムで検出した。反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

- [0142] その結果、第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの241RN3を用いたRT-ICANの感度が10⁵コピーであるのに対し、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-7)にアニールする7塩基を5'末端に付加した(A12)241RN3プライマーを用いた場合、感度は10³コピーとなり、感度が2桁向上した。また、10⁵コピーの検出速度も約1分速くなった。

[0143] 以上のことから、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする配列を第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加したものをラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとして用いることによる感度、検出速度の向上が認められた。

[0144] (B) 検討2

1step RT-ICANの反応に及ぼす、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする配列を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの効果について検討した。

[0145] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを、逆転写反応とICAN反応を同一チューブ内で同時に行う1step RT-ICANの反応系に添加して感度、検出速度を検討した。

まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%B SA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの134FN3(16)プライマー(配列表の配列番号20)と第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(16)プライマー 各25pmol、RTase M-MLV(タカラバイオ社製) 50U、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHIII 0.05U、サイバーグリーン(タカラバイオ社製)を含む反応液24 μ lと、さらにラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12-223Rプライマー 2.5pmolを加えた反応液24 μ lに1 μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により45℃で5分、55℃で45分保持し、増幅産物をリアルタイムで検出した。また、反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

[0146] その結果、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12-223Rプライマーを添加しなかった1step RT-ICANの感度が 10^3 コピーであるのに対し、A12-223Rプライマーを添加することにより感度は 10^2 コピーとなり、感度が1桁向上した。また、 10^3 コピーの検出速度も約4分速くなった。

- [0147] 以上のことから、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを1step RT-ICANの反応に加えることにより、感度、検出速度の向上が認められた。
- [0148] 実施例2
- (1)サイクリングプローブ法を用いたリアルタイム検出系でのヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼ2遺伝子(ALDH2)の多型検出における効果の検討
- [0149] ICAN反応とサイクリングプローブ法を用いたリアルタイム検出による多型検出に対する効果について検討した。検討対象としては、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼ2酵素をコードしている遺伝子(GenBank Acc. No. :AH002599)を選択した。該遺伝子においてエキソン12には、487番目のグルタミン酸(GAA)がリジン(AAA)に置換する一塩基多型が存在し、飲酒に関連した体質の個人差に深く関係し、発ガンリスクに関与することがこれまでに報告されている。
- [0150] ICAN反応系でこのアルデヒドデヒドロゲナーゼ2遺伝子の多型検出を行うために、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーに相当するICAN-ALDH2-Fプライマー(配列表の配列番号21)、第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーに相当するICAN-ALDH2-Rプライマー(配列表の配列番号22)をDNA合成機(Applied Biosystems社製)により合成した。次に、正常型検出用ALDH2 wGプローブ(配列表の配列番号23)及び変異型検出用ALDH2 mAプローブ(配列表の配列番号24)を合成した。ここで、正常型検出用ALDH2 wGプローブは、5'末端に蛍光標識としてROX標識(Applied Biosystems社製)、3'末端にクエンチング標識としてEclipse(Epoch Biosciences社製)を、変異型検出用ALDH2 mAプローブは、5'末端に蛍光標識としてFAM標識(Applied Biosystems社製)、3'末端にクエンチング標識としてEclipseを付加したDNA-RNA-DNAタイプのオリゴヌクレオチドプローブである。
- [0151] さらに、上記第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1〜-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加し、ICAN-ALDH2-Rプライマー付近に設定したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのALDH2-TH1(配列表の配列番号25;ICAN-ALDH2-Rキメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して-1〜+15)、ALDH2-TH2(配列表の配列番号26;ICAN-ALDH2-Rキメラオリゴヌクレオチドプラ

イマーに対して-9〜+6)、ALDH2-TH3(配列表の配列番号27; ICAN-ALDH2-Rキメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して-17〜-2)を合成した。

- [0152] 鋳型となるゲノムDNAは、インフォームドコンセントの得られた、抗凝固剤としてEDTAを用いた血液サンプルより、QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN社)を用いて調製した。
- [0153] ICAN反応の反応条件は以下の通りである。すなわち、最終濃度32mM HEPE S-KOH緩衝液、pH7. 8、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、1% ジメチルスルホキシド、0. 04% プロピレンジアミン、0. 11% ウシ血清アルブミン、各600 μ M dNTPs、4U BcaBEST DNAポリメラーゼ、100U Tli RNaseH II、各50pmolのICAN-ALDH2-FプライマーおよびICAN-ALDH2-Rプライマー、5. 5pmol ALDH2 wGプローブ、6pmol ALDH2 mAプローブ、鋳型となるゲノムDNA 100ngを基本とし、このまま、もしくはラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのALDH2-TH1あるいはALDH2-TH2あるいはALDH2-TH3を1pmol加え、滅菌水にて最終容量25 μ lにした。該反応液をスマートサイクラー(タカラバイオ社製)にセットし、70℃、5分処理したあと、56℃、60分温度を保持した。なお、蛍光強度の測定は、56℃で保持しているときに、1分ごとに測定した。
- [0154] また、ゲノムDNAを鋳型とし、ALDH2-Fプライマー(配列表の配列番号28)およびALDH2-Rプライマー(配列表の配列番号29)のプライマー対を用いてPCRを行い、得られた増幅産物をMicrocon-30(ミリポア社)で精製した後、Eco 57Iで消化し、3% NuSieve3:1アガロールゲル(タカラバイオ社製)にて電気泳動を行い、RF LPによるタイピングも行った。
- [0155] PCRは、TaKaRa ExTaq(タカラバイオ社製)を用いて行った。すなわち、最終濃度1×ExTaq緩衝液、各200 μ M dNTPs、1. 25U ExTaq、各10pmolのALDH2-FプライマーおよびALDH2-Rプライマー、鋳型となる核酸として調製したヒトゲノムDNA 5 μ lを添加し、滅菌水にて最終容量50 μ lにした。該反応液をサーマルサイクラーSP(タカラバイオ社製)にセットし、94℃、30秒のあと、94℃、30秒、55℃、30秒、72℃、30秒のサイクルを30サイクル繰り返した。
- [0156] Eco 57Iは、CTGAAGを認識する制限酵素であり、アルデハイドデハイドロゲナ

ーゼ2の正常型由来の増幅産物を切断するが、変異型由来の増幅産物は切断しない。

- [0157] その結果、Eco 57IでのPCR RFLPにおいて、増幅産物が切断されたものと切断されなかったものの三本のフラグメントが観察された、すなわちヘテロ接合体と考えられるゲノムDNAサンプルを用いた場合、ALDH2-TH1、ALDH2-TH2、ALDH2-TH3を反応系に加えた場合、以下の表1および2に示されるように、スレッショールドラインを100とし、このラインとサンプルの増幅曲線が交差するポイントであるCt値が小さくなる、すなわち反応性の上昇が認められた。また、ALDH2-TH3の場合では確認されなかったが、ALDH2-TH1、ALDH2-TH2を加えた場合はFAMの蛍光強度が増大する、すなわち検出効率が増大したことが確認された。

- [0158] [表1]

表1 Ct値の変化

	無添加	ALDH2-TH1	ALDH2-TH2	ALDH2-TH3
ROX (wild)	30.3~33.03	21.01~23.87	21.06~27.37	22.91~24.05
FAM (mutant)	36.45~40.44	22.9~28.0	25.65~27.98	24.83~34.71

- [0159] [表2]

表2 蛍光強度

	無添加	ALDH2-TH1	ALDH2-TH2	ALDH2-TH3
ROX (wild)	350~340	330~350	350~370	340~380
FAM (mutant)	150~245	285~370	370~380	145~250

- [0160] Eco 57IでのRFLPにおいて増幅産物が切断されたことによる二本のフラグメントが観察された、すなわち正常型のホモ接合体と考えられるゲノムDNAサンプルを用いた場合はALDH2 wGプローブ由来のROX蛍光シグナルのみが認められ、Eco 57IでのRFLPにおいて、増幅産物が切断されずに一本のフラグメントが観察された、すなわち、変異型のホモ接合体と考えられるゲノムDNAサンプルを用いた場合にはALDH2 mAプローブ由来の6-FAM蛍光シグナルのみが認められた。これらの場合、スレッショールドラインを100とし、このラインとサンプルの増幅曲線が交差するポイントであるCt値が小さくなる、すなわち、反応性の上昇が認められた。

- [0161] (2)ALDH2多型検出における反応系に添加するラダー形成オリゴヌクレオチドプラ

イマーの5'末端に付加した塩基配列の効果の検討

- [0162] 実施例2-(1)でのICAN反応とサイクリングプローブ法を用いたリアルタイム検出による多型検出に対する効果において、検討対象として選択したヒトアルデヒドデハイドロゲナーゼ2酵素をコードしている遺伝子の検出の際、反応系に添加するラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加した塩基配列の効果について検討した。
- [0163] 実施例2-(1)と同様に、ICAN反応系でこのアルデヒドデハイドロゲナーゼ2遺伝子の多型検出を行うためのICAN-ALDH2-Fプライマー、ICAN-ALDH2-Rプライマー、正常型検出用ALDH2 wGプローブ及び変異型検出用ALDH2 mAプローブを用意した。正常型検出用ALDH2 wGプローブは、5'末端に蛍光標識としてROX標識、3'末端にクエンチング標識としてEclipseを、一方、変異型検出用ALDH2 mAプローブは、5'末端に蛍光標識としてFAM標識、3'末端にクエンチング標識としてEclipseを付加したDNA-RNA-DNAタイプのオリゴヌクレオチドプローブである。
- [0164] さらに、ICAN-ALDH2-Fプライマーの上流領域(-1~-12)にアニールする12塩基を5'末端に付加し、ICAN-ALDH2-Rプライマー付近に設定したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのALDH2-TH2(ICAN-ALDH2-Rキメラプライマーに対して-9~+6)と、この当該プライマーの5'末端に付加してある12塩基を除いたALDH2-TH4(配列番号30)を合成した。
- [0165] 鋳型となるゲノムDNAは、インフォームドコンセントの得られた、抗凝固剤としてEDTAを用いた血液サンプルより、QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN社)を用いて調製したものの中で、RFLPによるタイピングによりヘテロ接合体と確認されたものを使用した。
- [0166] ICAN反応の反応条件は以下の通りである。すなわち、最終濃度32mM HEPE S-KOHバッファー、pH7. 8、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、1% ジメチルスルホキシド、0.04% プロピレンジアミン、0.11% ウシ血清アルブミン、各600 μ M dNTPs、4U BcaBEST DNAポリメラーゼ、100U Tli RNase HII、各50pmolのICAN-ALDH2-FプライマーおよびICAN-ALDH2-Rプライ

マー対、5. 5pmol ALDH2 wGプローブ、6pmol ALDH2 mAプローブ、鋳型となるゲノムDNA 100ngを基本とし、このまま、もしくはラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのALDH2-TH2あるいはALDH2-TH4を1pmol加え、滅菌水にて最終容量25 μ lにした。該反応液をスマートサイクラー(タカラバイオ社製)にセットし、70℃、5分処理したあと、56℃、60分温度を保持した。なお、蛍光強度の測定は、56℃で保持しているときに、1分ごとに測定した。

- [0167] その結果、ALDH2-TH2を反応系に加えた場合、以下の表3および4に示されるように、スレッショールドラインを100とし、このラインとサンプルの増幅曲線が交差するポイントであるCt値が小さくなる、すなわち反応性の上昇が認められた。また、ROX、FAMの蛍光強度が増大する、すなわち検出効率が増大したことが確認された。一方、ALDH2-TH4を反応系に加えた場合は、Ct値に変化は認められず、蛍光強度にも変化は認められなかった。すなわち、ALDH2-TH2の5'に付加してある、ICAN-ALDH2-Fプライマーの上流領域(-1~-12)にアニールする12塩基のないALDH2-TH4を反応系に加えた場合には、ALDH2-TH2で確認される反応性の上昇、検出効率の増大は確認されなかった。

- [0168] [表3]

表3 Ct値の変化

	無添加	ALDH2-TH2	ALDH2-TH4
ROX (wild)	28.2	23.9	27.2
FAM (mutant)	34.08	24.7	34.8

- [0169] [表4]

表4 蛍光強度

	無添加	ALDH2-TH2	ALDH2-TH4
ROX (wild)	310~320	410~420	350~360
FAM (mutant)	270~290	465~475	230~240

- [0170] (3)レジオネラ検出における反応系に添加するラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加した塩基配列の効果の検討
- [0171] 第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1~-12あるいは-13~-24)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマ

ーを添加し、ICAN反応における検出速度の変化を検討した。

- [0172] ICAN反応とサイクリングプローブ法を用いたリアルタイム検出に対する効果について検討した。検討対象としては、レジオネラ Mip (*Legionella pneumophila*, macrophage infectivity potentiator (Mip); GenBank Acc. No. : AF095215) 遺伝子をコードしている遺伝子を選択した。

ICAN反応系でこのレジオネラMip遺伝子の検出を行うために、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーのF2キメラオリゴヌクレオチドプライマー (配列表の配列番号31) および第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーのR2キメラオリゴヌクレオチドプライマー (配列表の配列番号32) をDNA合成機 (アプライド・バイオシステム社製) により合成した。次に、Mip遺伝子検出用 Mip4g12プローブ (配列表の配列番号33) を合成した。また、Mip遺伝子検出用 Mip4g12プローブは、5'末端に蛍光標識としてFAM標識、3'末端にクエンチング標識としてEclipseを付加したDNA-RNA-DNAタイプのオリゴヌクレオチドプローブである。

- [0173] さらに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域 (-1 - 12あるいは-13 - 24) にアニールする12塩基を5'末端に付加し、第一キメラオリゴヌクレオチドプライマー付近に設定したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのR2 (-13) (配列表の配列番号34; 第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して-13 - 29)、R2 (-13) A12-1 (配列表の配列番号35; 第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して-13 - 29部分の5'末端に第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域 -1 - 12の12塩基を付加した)、R2 (-13) A12-2 (配列表の配列番号36; 第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して-13 - 29部分の5'末端に第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域 -13 - 24の12塩基を付加した) を合成した。
- [0174] 鋳型となるゲノムDNAは、EnviroAmpTM (PERKIN ELMER社製) に添付の *Legionella pneumophila* Control DNAを使用した。

- [0175] ICAN反応の反応条件は以下の通りである。すなわち、最終濃度32mM HEPE S-KOHバッファー、pH7.8、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、1% ジメチルスルホキシド、0.11% ウシ血清アルブミン、各500 μ M dNTPs、2U BcaBEST DNAポリメラーゼ、100U Tli RNaseHIII、各25pmolのF2キメラオ

リボヌクレオチドプライマーおよびR2キメラオリゴヌクレオチドプライマー、5pmol Mi p 4g12プローブ、鋳型となるControl DNA 200コピーを基本とし、このまま、もしくはR2(-13)A12-1あるいはR2(-13)A12-2を1pmol加え、滅菌水にて最終容量25 μ lにした。該反応液をスマートサイクラー(タカラバイオ社製)にセットし、70℃、5分処理したあと、53℃、90分温度を保持した。なお、蛍光強度の測定は、53℃で保持しているときに、1分ごとに測定した。

- [0176] その結果を表5に示す。表5に示したように、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのR2(-13)A12-1あるいはR2(-13)A12-2を反応系に加えた場合、スレッショールドラインを100とし、このラインとサンプルの増幅曲線が交差するポイントであるCt値が小さくなる、すなわち反応性の上昇が認められた。

- [0177] [表5]

表5 Ct値の変化

	無添加	R12(-13)A12-1	R12(-13)A12-2
FAM	74.17~81.12	44.11~54.61	48.03~55.89

- [0178] 実施例3

(1)鋳型となる核酸上で、双方のICAN primerの上流領域に存在する相補的配列のICANの反応に及ぼす効果1

- [0179] 鋳型となる核酸上で、双方のICAN primerの5'末端より上流領域に6塩基の相補的な配列を挿入し、ICAN反応に及ぼす影響を見た。検出対象は、ヒトc-Ki-ras 2遺伝子(GenBank Acc. No.:L00045)を選択した。

- [0180] 双方のICAN primerの5'末端上流領域に明確な相補的な配列がない鋳型と6塩基の相補的な配列を有する鋳型は以下のように調製した。

Human genome(クロンテック社より購入)を鋳型にc-Ki-ras/12Fプライマー(配列表の配列番号37)とrasT1Rプライマー(配列表の配列番号38)あるいは双方のプライマーの5'末端に相補的な配列を付加したrasT14Fプライマー(配列表の配列番号39)とrasT4Rプライマー(配列表の配列番号40)を用いて、PCRを行った。得られた断片を平滑化し、プラスミドpUC118(タカラバイオ社製)のHincIIサイトに挿入した。得られたプラスミドより、c-Ki-ras/12FプライマーあるいはrasT14Fプ

ライマーがpUC118にアニールするM13 primer M4(タカラバイオ社製)と同方向であるプラスミドを選別した。その結果、双方のICAN primerの5'末端上流領域に明確な相補的な配列がないプラスミドT7と6塩基の相補的な配列CGCGCGを有するプラスミドT16を得た。

[0181] 上記調製したプラスミドDNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 コピーに調製した。最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、c-Ki-ras/12FN3キメラオリゴヌクレオチドプライマー(配列表の配列番号41)とc-Ki-ras/12RN3キメラオリゴヌクレオチドプライマー(配列表の配列番号42) 各30pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 2.8U、国際公開第02/22831号パンフレット 実施例7に記載の方法で調製したAfu RNase HII 2.2U、を含む反応液24 μ lに、1 μ lの各コピー数の鋳型DNAを添加し、サーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)で、55°Cで60分反応した。増幅産物は3%アガロースゲル電気泳動により確認した。

[0182] その結果、双方のICAN primerの5'末端上流領域に明確な相補的な配列がないプラスミドT7を鋳型とした場合、増幅産物はターゲット領域のサイズのバンドしか見られず、安定した感度が 10^3 コピーであるのに対し、双方のICAN primerの5'末端に隣接する上流領域に相補的な配列CGCGCGを有するプラスミドT16を鋳型にした場合、ターゲット領域のサイズのバンドとともに高分子側に規則正しいラダー状の産物が見られ、10コピーが安定して検出され、感度が向上した。また、ラダー産物をゲルより切り出し、pUC118のHincIIサイトにサブクローニングして、塩基配列を決定したところ、ラダー産物はターゲット領域が双方のICAN primerの5'末端上流領域に存在する相補的な配列CGCGCGを介して、ターゲット領域が同方向に連結したものであった。

以上のことから、双方のICAN primerの5'末端上流領域に存在する相補的な配列により、ターゲット領域の重合反応が促進され、感度の向上が認められた。

[0183] (2)鋳型となる核酸上で、双方のICAN primerの上流領域に存在する相補的配列のICANの反応に及ぼす効果2

[0184] 鋳型となる核酸上で、双方のICAN primerの5'末端より上流領域にある3塩基の相補的な配列のICAN反応に及ぼす影響を見た。検出対象は、淋菌cppB(*Neisseria gonorrhoeae* cryptic plasmid protein(cppB); GenBank Acc. No. : M10316)遺伝子を選択した。

[0185] 鋳型は以下のように調製した。

淋菌ゲノム(住商ファーマインターナショナルより購入)を鋳型にPJDBFプライマー(配列表の配列番号43)とPJDBRプライマー(配列表の配列番号44)を用いて、PCRを行った。得られた断片を平滑化し、プラスミドpUC118(タカラバイオ社製)のHincI Iサイトに挿入した。得られたプラスミドより、PJDBFプライマーがpUC118にアニールするM13 primer M4(タカラバイオ社製)と同方向であるプラスミドを選別しプラスミドCp13を得た。

上記プラスミドCp13を鋳型に、インサート領域を増幅するために、PJDB0FN3プライマー(配列表の配列番号45)とPJDB0RN3プライマー(配列表の配列番号46)を設計した。この場合、PJDB0RN3プライマーの5'末端に隣接した上流の配列3塩基であるGACに相補的な配列であるGTCはPJDB0FN3プライマー鎖のターゲット領域ではなく、PJDB0FN3プライマーの5'末端より上流34塩基の位置に存在する。この3塩基のICANに及ぼす影響を見た。

[0186] 上記調製したプラスミドDNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 コピーに調製した。最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、PJDB0FN3キメラオリゴヌクレオチドプライマーとPJDB0RN3キメラオリゴヌクレオチドプライマー 各30pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 2.8U、Afu RNaseHIII 2.2Uを含む反応液24 μ lに、1 μ lの各コピー数の鋳型DNAを添加し、サーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)で、55℃で60分反応した。増幅産物は3%アガロースゲル電気泳動により確認した。

[0187] その結果、ターゲット領域のサイズのバンドとともに高分子側に規則正しいラダー状の産物が見られ、 10^2 コピーまで高感度に検出された。また、ラダー産物をゲルより切

り出し、pUC118のHincIIサイトにサブクローニングして、塩基配列を決定したところ、ラダー産物はターゲット領域が双方のICAN primerの5'末端上流領域に存在する相補的な3塩基GACとGTCを介して、ターゲット領域が同方向に規則正しく連結したものであった。すなわち、このラダー増幅産物にはICANプライマーに挟まれたターゲット領域とともに、PJDB0FN3キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端より上流領域34塩基がターゲット領域に挟まれた形で規則正しく含まれていた。

[0188] 以上のことから、双方のICAN primerの5'末端上流領域に存在する相補的な配列3塩基で、ターゲット領域の重合反応が促進され、高感度増幅出来ることが確認された。また、増幅産物の検出をプローブによるハイブリで行う場合、プローブの位置は双方のICAN primerにはさまれた領域、あるいは、ICAN primerと双方のICAN primerの5'末端上流領域に存在する相補的な配列にはさまれた領域から選定できることが示された。

[0189] 実施例4

ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加する、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする塩基の長さを6塩基、9塩基、12塩基（-1-6、-1-9、-1-12）とした逆転写プライマーを用いて、RT-ICANの感度、検出速度を検討した。

[0190] まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。

最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、上記逆転写プライマーとしてラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの215Rプライマー、A6-215Rプライマー（配列表の配列番号47）、A9-215Rプライマー（配列表の配列番号48）、あるいは、A12-215Rプライマー 各1pmol、RTase M-MLV（タカラバイオ社製）50U、1 μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加した10 μ lの反応液を調製した。

[0191] 該反応液はサーマルサイクラーパーソナル（タカラバイオ社製）にセットし、45℃、10分間保持後、4℃に冷却した。逆転写反応終了後、該反応液10 μ M 酢酸カリウ

ム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーのB134FN3(16)プライマーと第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(16)プライマー 各25pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHIII 0.05U、サイバーグリーンを含む反応液15 μ lを添加し、Rotor gene(CORBETT RESEARCH社製)により55°CでICAN反応を行い、増幅産物をリアルタイムで検出した。また、反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

- [0192] その結果、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(−1〜6)にアニールする6塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA6-215Rを用いた場合、感度は 10^2 コピーであった。6塩基付加することによる検出速度を速める効果は0.9分であった。

第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(−1〜9)にアニールする9塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA9-215Rを用いた場合、感度は 10^2 コピーであった。9塩基付加することによる検出速度を速める効果は1.6分であった。

第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(−1〜12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12-215Rを用いた場合、感度は 10^1 コピーであった。12塩基付加することによる検出速度を速める効果は3.7分であった。

- [0193] 以上のことから、ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加されている第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする配列の効果は、その塩基数が多いほど大きいことが確認された。

- [0194] 実施例5

ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端に付加する、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする塩基の長さを12塩基、18塩基、(−1〜12、−1〜18)とした逆転写プライマーを用いたRT-ICANの感度について検討した。

- [0195] まず、上記実施例1-(1)で調製した鋳型RNAをOD260値より計算し、1 μ lあたり

10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 コピーに調製した。

最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、上記逆転写プライマーとしてラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(18)プライマー、A12-205Rプライマー、あるいは、A18-205Rプライマー(配列表の配列番号49)各1pmol、RTase M-MLV(タカラバイオ社製) 50U、1 μ lの各コピー数の鋳型RNAを添加した10 μ lの反応液を調製した。

[0196] 該反応液はサーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)にセットし、45℃、10分間保持後、4℃に冷却した。逆転写反応終了後、該反応液10 μ lに最終濃度32mM HEPES-KOH緩衝液(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.11%BSA、4mM 酢酸マグネシウム、各500 μ M dNTPsに、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーのB134FN3(18)プライマーと第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーの205RN3(18)プライマー 各25pmol、BcaBEST(タカラバイオ社製) 11U、Tli RNaseHIII 0.05Uを含む反応液15 μ lを添加し、サーマルサイクラーパーソナル(タカラバイオ社製)により55℃でICAN反応を行い、増幅産物を3%アガロースゲル電気泳動によっても確認した。

[0197] その結果、205RN3プライマーで逆転写したRT-ICANの感度が 10^2 コピーであるのに対し、同じ位置で第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1〜12)にアニールする12塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA12-205Rを用いた場合、および、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域(-1〜18)にアニールする18塩基を5'末端に付加したラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーのA18-205Rを用いた場合感度は 10^1 コピーとなり、いずれの場合においても感度が1桁向上した。また、A12-205R、あるいは、A18-205Rを用いた場合の増幅はプライマー上流域のアニールする配列を介して連結した規則正しいラダー状の増幅産物であることが確認された。

[0198] 以上のことから、第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの上流領域にアニールする塩基の数を変えても、その領域を介したラダー増幅が起こり、感度の向上が認められた。

産業上の利用可能性

- [0199] 本発明により、従来の等温核酸増幅方法より優れた増幅方法、該方法に用いるためのプライマーを含む組成物およびキットが提供された。

配列表フリーテキスト

- [0200] SEQ ID NO. 1: A portion of SARS coronavirus genomic RNA reverse transcribed to DNA. "nucleotide 1 to 5 is HindIII restriction site- nucleotide 238 to 242 is BamHI restriction site."

SEQ ID NO. 2: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as 205RN3(18) for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 3: Designed oligonucleotide primer designated as A12-205R for synthesizing cDNA from mRNA.

SEQ ID NO. 4: Designed oligonucleotide primer designated as 215R for synthesizing cDNA from mRNA.

SEQ ID NO. 5: Designed oligonucleotide primer designated as A12-215R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 6: Designed oligonucleotide primer designated as A12-223R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 7: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as 134FN3(18) to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 8: Designed oligonucleotide primer designated as A12(-10)-215R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 9: Designed oligonucleotide primer designated as A12(-20)-215R for

synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 10: Designed oligonucleotide primer designated as A12(6)-215R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 11: Designed oligonucleotide primer designated as A12(12)-215R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 12: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as B134FN3(16) to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 14 to 16 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides." "5'-end is labeled with biotin."

SEQ ID NO. 13: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as 205RN3(16) to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 14 to 16 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 14: Designed oligonucleotide primer designated as A6(-10)-215R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 15: Designed oligonucleotide primer designated as A9(-10)-215R for synthesizing cDNA from mRNA, and to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 16: Designed oligonucleotide probe designated as SARS-BNI-B for detecting an amplified a portion of SARS coronavirus genome. "5'-end is labeled with FITC."

SEQ ID NO. 17: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as 160FN3 to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 18: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as 241RN3

to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 12 to 14 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 19: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as (A12)241RN3 to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 18 to 21 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 20: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as 134FN3(16) to amplify a portion of SARS coronavirus genome. "nucleotides 14 to 16 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 21: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as ICAN-ALDH2-F to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 22: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as ICAN-ALDH2-R to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 23: Designed chimeric oligonucleotide probe designated as ALDH2 wG probe for detecting an amplified a portion of native human aldehyde dehydrogenase 2 gene. "nucleotides 11 is ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides." "5'-end is labeled with ROX, and 3'-end is labeled with Eclipse."

SEQ ID NO. 24: Designed chimeric oligonucleotide probe designated as ALDH2 mA probe for detecting an amplified a portion of mutant human aldehyde dehydrogenase 2 gene. "nucleotides 11 is ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides." "5'-end is labeled with FAM, and 3'-end is labeled with Eclipse."

SEQ ID NO. 25: Designed oligonucleotide primer designated as ALDH2-TH1 to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene.

SEQ ID NO. 26: Designed oligonucleotide primer designated as ALDH2-TH2 to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene.

SEQ ID NO. 27: Designed oligonucleotide primer designated as ALDH2-TH3 to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene.

SEQ ID NO. 28: Designed oligonucleotide PCR primer designated as ALDH2-F to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene.

SEQ ID NO. 29: Designed oligonucleotide PCR primer designated as ALDH2-R to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene.

SEQ ID NO. 30: Designed oligonucleotide primer designated as ALDH2-TH4 to amplify a portion of human aldehyde dehydrogenase 2 gene.

SEQ ID NO. 31: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as F2 to amplify a portion of *Legionella pneumophila* mip gene. "nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 32: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as R2 to amplify a portion of *Legionella pneumophila* mip gene. "nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 33: Designed chimeric oligonucleotide probe designated as Mip4g12 probe for detecting an amplified a portion of *Legionella pneumophila* mip gene. "nucleotides 4 is ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides." "5'-end is labeled with FAM, and 3'-end is labeled with Eclipse."

SEQ ID NO. 34: Designed oligonucleotide primer designated as R2(-13) to amplify a portion of *Legionella pneumophila* mip gene.

SEQ ID NO. 35: Designed oligonucleotide primer designated as R2(-13)A12-1 to amplify a portion of *Legionella pneumophila* mip gene.

SEQ ID NO. 36: Designed oligonucleotide primer designated as R2(-13)A12-2 to amplify a portion of *Legionella pneumophila* mip gene.

SEQ ID NO. 37: Designed oligonucleotide PCR primer designated as c-Ki-ras/12F to amplify a portion of human c-Ki-ras2 gene.

SEQ ID NO. 38: Designed oligonucleotide PCR primer designated as rasT1R to amplify a portion of human c-Ki-ras2 gene.

SEQ ID NO. 39: Designed oligonucleotide PCR primer designated as rasT14F to amplify a portion of human c-Ki-ras2 gene.

SEQ ID NO. 40: Designed oligonucleotide PCR primer designated as rasT4R to amplify a portion of human c-Ki-ras2 gene.

SEQ ID NO. 41: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as c-Ki-ras/12FN3 to amplify a portion of human c-Ki-ras2 gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 42: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as c-Ki-ras/12RN3 to amplify a portion of human human c-Ki-ras2 gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 43: Designed oligonucleotide primer designated as PJDBF to amplify a portion of Neisseria gonorrhoeae cppB gene.

SEQ ID NO. 44: Designed oligonucleotide primer designated as PJDBR to amplify a portion of Neisseria gonorrhoeae cppB gene.

SEQ ID NO. 45: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as PJDB0FN3 to amplify a portion of Neisseria gonorrhoeae cppB gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 46: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as PJDB0RN3 to amplify a portion of Neisseria gonorrhoeae cppB gene. "nucleotides 15 to 17 are ribonucleotide- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO. 47: Designed oligonucleotide primer designated as A6-215R to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

SEQ ID NO. 48: Designed oligonucleotide primer designated as A9-215R to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

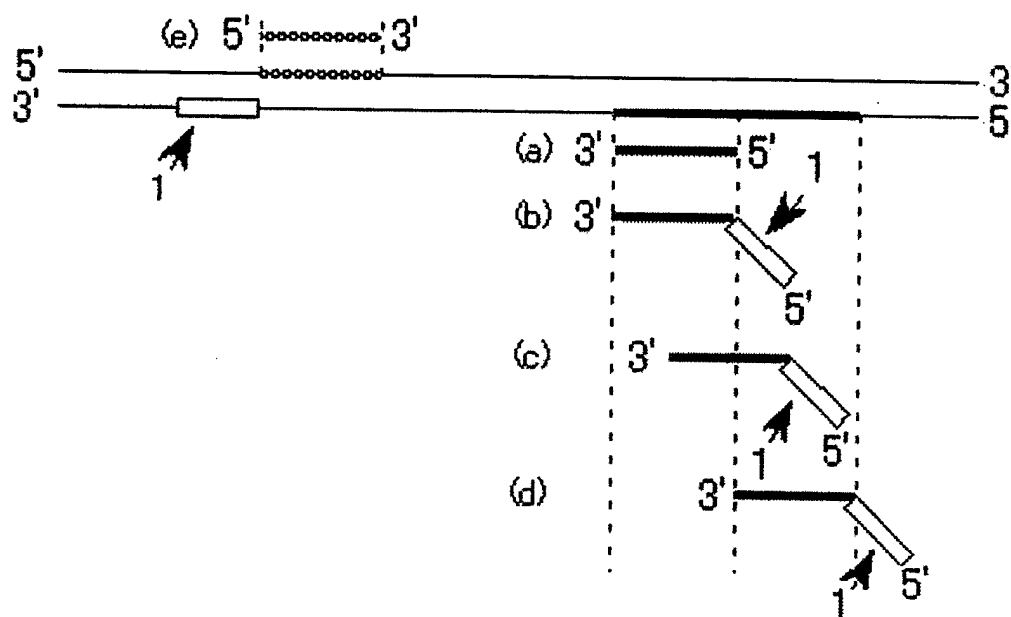
SEQ ID NO. 49: Designed oligonucleotide primer designated as A18-205R to amplify a portion of SARS coronavirus genome.

請求の範囲

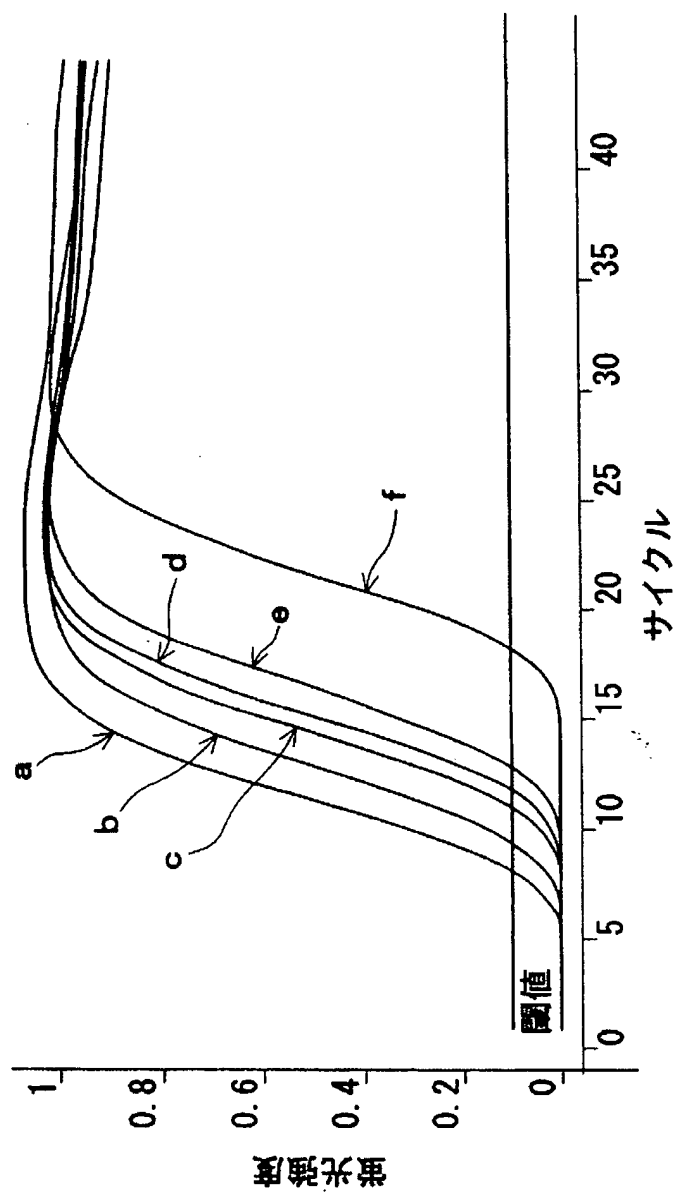
- [1] 核酸を増幅する方法において、
- (A) 下記(a)又は(b)から選択される反応混合物を調製する工程、
- (a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseH、
- (b) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseH、
- ここで、一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーはラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとして作用し、
- ここで、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されており、
- 上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に相補的な第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型となる核酸の塩基配列に相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2種類を含んでおり、
- 上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域および／またはその領域より3'側の塩基配列に相補的な配列を有し、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに5'側方向の領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な配列を5'側に有し、
- および
- (B) 鋳型となる核酸へのプライマーの特異的なアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長鎖合成反応及び鎖置換反応、並びにRNaseHによる伸長鎖の切断反応が行える一定の温度条件でラダー状増幅産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、
- を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。

- [2] 鋳型となる核酸がRNAであり、当該核酸をあらかじめデオキシリボヌクレオチド3リン酸、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼ及び少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーで処理し、逆転写産物とする、請求項1記載の方法。
- [3] 工程(A)における反応混合物がさらに逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含有する、請求項1記載の方法。
- [4] 鋳型となる核酸がmRNAであることを特徴する、請求項2又は3記載の方法。
- [5] 逆転写活性と鎖置換活性とを有する1つのDNAポリメラーゼが、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼおよび鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして作用することを特徴とする、請求項2又は3記載の方法。
- [6] 請求項1記載の核酸の増幅方法のための組成物であって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物。
- [7] 請求項1記載の核酸の増幅方法のためのキットであって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを含有するキット。
- [8] 下記工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法;
 - (a) 請求項1記載の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程;および、
 - (b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程。
- [9] 請求項1記載の核酸の増幅方法に用いるプライマーであって、鋳型となる核酸と相同的なプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに5'側方向の領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な配列を5'側に有することを特徴とするオリゴヌクレオチドプライマー。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/16639 A1 (TAKARA SHUZO CO., LTD.), 28 February, 2002 (28.02.02), Particularly, Claims; Fig. 35 & AU 7878301 A & CA 2417798 A & JP 2003-070490 A & US 2003/0073081 A1 & EP 1312682 A1	1-8
A	WO 00/28082 A1 (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA), 18 May, 2000 (18.05.00), Abstract; Claims & EP 1020534 A1 & WO 01/34790 A1 & WO 01/34838 A1 & CA 2390309 A & AU 3330800 A & AU 1057801 A & BR 0015382 A & EP 1231281 A & JP 2002-330796 A & NO 20022171 A & US 6410278 B1 & US 2004/132144 A1	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 March, 2005 (04.03.05)

Date of mailing of the international search report
22 March, 2005 (22.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018137

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	JP 2005-52002 A (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 03 March, 2005 (03.03.05), Particularly, Claim 2; Par. Nos. [0021], [0022] (Family: none)	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018137

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 9
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018137

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

The oligonucleotide primer as set forth in the above claim is specified as containing a structure corresponding to the structure of a nucleic acid which is arbitrarily selected and serves as a template but characteristic matters thereof such as its nucleic acid sequence for understanding it as a substance are not sufficiently clearly indicated. Thus, the above-described oligonucleotide primer is unclear as a substance and, therefore, does not comply with the prescribed requirement to such an extent that no meaningful international search can be carried out (PCT Article 17(2)(a)(ii)).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/00, C12Q1/68			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/00, C12Q1/68			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	WO 02/16639 A1 (TAKARA SHUZO CO., LTD.), 2002.02.28 特に請求の範囲及び図35参照 & AU 7878301 A & CA 2417798 A & JP 2003-070490 A & US 2003/0073081 A1 & EP 1312682 A1	1-8	
A	WO 00/28082 A1 (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA), 2000.05.18 要約及び請求の範囲参照 & EP 1020534 A1 & WO 01/34790 A1 & WO 01/34838 A1 & CA 2390309 A & AU 3330800 A & AU 1057801 A & BR 0015382 A & EP 1231281 A1 & JP 2002-330796 A	1-8	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 04.03.2005		国際調査報告の発送日 22.3.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4 B 9639
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EX	& NO 20022171 A & US 6410278 B1 & US 2004/132144 A1 JP 2005-52002 A (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 2005. 03. 03 特に請求の範囲2及び段落0021, 0022参照 (ファミリーなし)	1-8

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 _____ 9 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
(別紙参照)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄 2. の別紙

上記請求の範囲に記載のオリゴヌクレオチドプライマーは、恣意的に選択されうる鋳型となる核酸の構造に対応する構造を含むものとして特定され、その核酸配列等、これを物質として把握するための固有の特定事項が十分に明示されていない。よって、上記オリゴヌクレオチドプライマーは物質として不明確であり、有意義な国際調査をなし得る程度にまで所定の要件を満たしていない。(PCT17条(2)(a)(ii))